



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional,
Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)

ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Tillandsia carlos-hankii* MATUDA

TESIS QUE PRESENTA:

BIÓL. TANIA MARISOL SUSAN TEPETLÁN

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE
RECURSOS NATURALES (BIODIVERSIDAD DEL NEOTRÓPICO)**

Directora:

DRA. DEMETRIA MARTHA MONDRAGÓN CHAPARRO

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Diciembre del 2016



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

SIP-14 BIS

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 10 del mes de Noviembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca** (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada "**Estructura y diversidad genética de *Tillandsia carlos-hankii* Matuda**"

Presentado por la alumna:

Susan

Apellido paterno

Tepetlán

materno

Tania Marisol

nombre(s)

Con registro:


B	1	4	0	0	4	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA
 Directora de tesis


 Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro


 Dr. José Antonio Santos Moreno


 Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez


 M. en C. Sonia Trujillo Argueta


 Dra. Cecilia Alfonso Corrado

EI PRESIDENTE DEL COLEGIO


 Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
 DE INVESTIGACION PARA EL
 DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
 CIIDIR
 UNIDAD OAXACA
 IPN




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 30 del mes de noviembre del año 2016, el (la) que suscribe **Susan Tepetlan Tania Marisol** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro B140047, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de las Dras. Demetria Martha Mondragón Chaparro y Cecilia Liana Alfonso Corrado, los derechos del trabajo titulado: "**Estructura y diversidad genética de *Tillandsia carlos-hankii* Matuda**", y cede los derechos al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradooax@ipn.mx ó tepetlania@gmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Susan Tepetlan Tania Marisol



AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Investigación y Desarrollo Integral Regional-Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional donde realice mis estudios de maestría.

A la Dra. Demetria Mondragón Chaparro por su gran apoyo, tanto académico como personal, sin ella la conclusión de esta maestría no hubiera sido posible.

A la Dra. Cecilia Alfonso Corrado por el tiempo y recursos que destinó a este trabajo.

A los Drs. José Antonio Santos, Rodolfo Solano y M.C. Sonia Trujillo Argueta por sus comentarios y atinadas sugerencias en las revisiones de este documento.

A los compañeros y amig@s que encontré en el camino, que se quedaron y que se fueron de mi vida académica y personal: Gloria Ponce, Adriana Ramírez, Laura Belem, Cynthia Ramírez, Coral Eloisa, Margarita Reyes, Gabriel, Francisco, Nelly y Monserrat. Gracias por el apoyo, la compañía y las enseñanzas

DEDICATORIA

A mis maestras de vida:

A mi Paulita

A Deme Mondragón

Resumen	1
Abstract	2
1.Introducción	3
2. Objetivos	
2.1 General	
2.2 Específicos	6
3.Marco teórico	7
3.1 Hábitat epífita	7
3.2 Gradiente altitudinal	7
3.3 Genética y Conservación	10
3.4 Equilibrio de Hardy & Weinberg	10
3.5 Marcadores moleculares	11
3.5.1 Inter Simple Sequence Repeats (ISSR 's)	12
3.6 Diversidad genética en bromelias	12
4. Materiales y Métodos	
4.1 Especie de estudio: <i>Tillandsia carlos-hankii</i> Matuda	15
4.2 Área de estudio	16
4.3 Colecta de material vegetal	17
4.4 Trabajo de laboratorio	
4.4.1 Extracción de ADN	18
4.4.2 Estandarización de los ISSR 's	20
4.4.3 Lectura de geles	22
5. Análisis de datos	23
6. Resultados	
6.1 Análisis genéticos	24
6.2 Estructura genética poblacional y flujo genético	25
6.3 Relaciones genéticas entre poblaciones	25
7. Discusión	
7.1 Diversidad genética interpoblacional	27
7.2 Diversidad genética intrapoblacional	28
7.3 Estructura genética y relaciones genéticas entre poblaciones	29
7.4 Conservación	31
Conclusiones	32
Literatura citada	33
ÍNDICE	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Algunas características demográficas de las poblaciones de <i>Tillandsia carlos-hankii</i> y parámetros ambientales de los sitios donde crecen. Tomado de Fernández-Ríos y colaboradores.	18
Cuadro 2	Secuencias de bases nitrogenadas para los ISSR's seleccionados para la replicación de ADN de <i>Tillandsia carlos-hankii</i> .	21
Cuadro 3	Reactivos y concentraciones utilizados en cada mezcla (15 μ l) para la amplificación (PCR) de los ISSR's en <i>Tillandsia carlos-hankii</i> .	21
Cuadro 4	Valores de diversidad genética para las 7 poblaciones de <i>T. carlos-hankii</i> .	24
Cuadro 5	Valores del AMOVA para las 7 poblaciones de <i>T. carlos-hankii</i> .	25
Cuadro 6	Matriz de distancias genéticas de Nei estimados entre pares de poblaciones.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Planta adulta de <i>Tillandsia carlos-hankii</i> Matuda	15
Figura 2	Mapa de localización para las 7 poblaciones de <i>T. carlos-hankii</i> en los bosques de Santa Catarina, Ixtepeji	17
Figura 3	Visualización del gel de agarosa al 1 % con tinción de bromuro de etidio (0.005 mg/ml)	20
Figura 4	Ejemplo de construcción de matrices de incidencia a partir de la visualización en geles de agarosa. Cada línea vista en el gel se transcribe como 1 dentro de la matriz	22
Figura 5	Dendograma estimado por (Unweighted Pair Group Method using Weinberg Arithmetic averages) para las 7 poblaciones de <i>T. carlos-hankii</i> . Se consideró en equilibrio de Hardy-Weinberg y se usó el método de distancias genéticas Nei (1978) con 10000 remuestreos	26
Figura 6	Prueba bilateral de Mantel utilizando la distribución de $r(AB)$ estimada a partir de 10000 permutaciones. Gráficos de dispersión y líneas de tendencia por pares de poblaciones sobre altitud (a) y distancias geográficas (b).	27

Resumen

Los estudios de diversidad genética en bromelias epífitas ponen de manifiesto que la capacidad de los individuos para responder a los cambios ambientales está en sus genes. A pesar de desarrollarse en circunstancias que afectan la variabilidad genética (fragmentación, aislamiento, clonalidad, autopolinización) las bromelias, generalmente presentan valores de medios a altos debido a que se han sobrepuesto a tales desventajas a través de adaptaciones para garantizar su éxito reproductivo. El sistema mixto de reproducción, los síndromes de polinización, semillas aladas y ligeras para la dispersión a larga distancia así como la tolerancia y hasta preferencia por ambientes perturbados y fragmentados son algunas de estas adaptaciones. *Tillandsia carlos-hankii* es una bromelia epífita amenazada y endémica del estado de Oaxaca, México. Sus poblaciones enfrentan diferentes circunstancias que pueden influir en una baja variación genética, tales como la extracción y comercialización, la perturbación antropogénica de sus hábitats y sus consecuencias ecológicas. En este trabajo se evaluó la diversidad y estructura genética de siete poblaciones de *T. carlos-hankii* a lo largo de un gradiente de altitud localizado entre 2428 a 2788 msnm y su relación con los nichos altitudinales, los cuales están ubicados en un bosque de pino-encino de la Sierra Norte de Oaxaca. Se estimó la diversidad genética intra e interpoblacional mediante marcadores moleculares ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats). Se obtuvo un promedio de 87.98% de loci polimórficos para las 7 poblaciones, lo cual se considera alto, y una heterocigosidad esperada de 0.386. El 83% , $P < 0.001$ de la diversidad genética se encontró dentro de las poblaciones, mientras que la variación entre las poblaciones fue del 17 %, $P < 0.001$. El índice de fijación poblacional fue $F_{st} = 0.77 \pm 0.18$ consistente con la poca diferenciación a nivel regional y el flujo génico fue de $Nm = 2.25$ considerado medianamente alto. Las poblaciones establecidas a mayor altitud, Loma Grande (2615), Peña Prieta I (2788), Peña Prieta II (2732) presentaron los valores de diversidad genética más altos, sin embargo, no hay una tendencia en los valores de diversidad genética con respecto a los pisos altitudinales.

Palabras clave: Estructura genética, bromelias epífitas, diversidad genética interpoblacional, intrapoblacional, pisos altitudinales.

Abstract

Studies of genetic diversity in epiphytes bromeliads shows that the ability of individuals to respond to environmental changes is in their genes. Despite developing in circumstances that affect genetic variability (fragmentation, isolation, clonality, self-pollination), bromeliads generally present medium-to-high values because they have overlap with such disadvantages through adaptations to ensure their reproductive success. The mixed reproduction system, pollination syndromes, winged and light seeds for long-distance dispersal as well as tolerance and even preference for disturbed and fragmented environments are some of these adaptations. *Tillandsia carlos-hankii* is an epiphytic bromeliad endangered and endemic to the state of Oaxaca, Mexico. Their populations face different circumstances that can influence a low genetic variation, such as the extraction and commercialization, the anthropogenic disturbance of their habitats and their ecological consequences. This work evaluated the diversity and genetic structure of seven populations of *T. carlos-hankii* along an altitude gradient located between 2428 and 2788 meters above sea level and their relationship with the altitudinal niches, which are located in a pine forest of the Sierra Norte de Oaxaca. Intra and interpopulation genetic diversity was estimated using molecular markers ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats). An average of 87.98% of polymorphic loci was obtained for the 7 populations, which is considered high, and an expected heterozygosity of 0.386. The 83%, $P < 0.001$ genetic diversity was found within populations, while the variation among populations was 17%, $P < 0.001$. The population fixation index was $F_{st} = 0.77 \pm 0.18$ consistent with little regional differentiation and gene flow was $N_m = 2.25$ considered medium-high. The highest established populations, Loma Grande (2615), Peña Prieta I (2788), Peña Prieta II (2732) had the highest values of genetic diversity, however, there is no trend in the values of genetic diversity with respect to the altitudinal floors.

Introducción

La biología de la conservación es la combinación de las ciencias puras y aplicadas en las que se hace uso de los principios de genética, biología de poblaciones, ecología, economía, sociología, filosofía y otras disciplinas para resolver problemas urgentes de forma práctica. Su meta principal es mantener la viabilidad de las poblaciones de plantas y animales (Loó, 2011).

La viabilidad de una población significa mantenerla de un tamaño suficiente en un hábitat de calidad para la supervivencia a largo plazo de una especie. Esto implica mantener la capacidad de las especies para el cambio evolutivo, es decir, mantener el potencial para responder al cambio ambiental en forma adaptativa (Hamrick, 1994; Loó, 2011).

La respuesta al cambio y posterior adaptación de las especies está en sus genes. El material genético de los organismos es la materia prima sobre la que actúa la evolución a través de la mutación, selección natural, deriva genética, endogamia y flujo genético como principales fuerzas evolutivas (Hedrick, 2005). Y es a través de la genética de poblaciones que se puede estimar y determinar la diversidad genética, reflejo de las fuerzas evolutivas, y cómo ésta se distribuye entre los individuos y entre las poblaciones (Murawski & Hamrick, 1990; Frankham *et al.*, 2002).

Los análisis de diversidad genética nos permiten saber cómo se van adaptando las especies, dadas las interacciones de la evolución a largo plazo y la historia ecológica a corto plazo. Los efectos de procesos como la fragmentación del hábitat, cambios en la distribución y el aislamiento de las poblaciones, se vislumbran a través de la medición de la variación dentro y entre poblaciones de especies (Hamrick, 1994; Hamrick & Godt, 1996); de la determinación de las relaciones filogenéticas entre ellas (Gitzendanner & Soltis, 2000), y de la variación genética en las poblaciones generalizadas (Loveless & Hamrick, 1984).

En general los estudios de diversidad genética en epífitas son muy escasos. Se ha documentado la variabilidad y estructura genética de dos helechos epífitos (Ranker, 1992; Hooper & Haufler, 1997), orquídeas (Ackerman & Ward 1999; Tremblay & Ackerman, 2001; Trapnell & Hamrick, 2004; Ávila-Díaz & Oyama, 2007, Chung *et al.* 2013) y bromelias (Soltis; 1987, Sarthou; 2003, González-Astorga, 2004; Versieux; 2007, Boisselier-Dubayle; 2010, del Castillo *et al.*; 2013, Cascante-Marín, 2011. En dichos estudios se reportan valores de diversidad genética de media a alta a pesar de encontrarse en circunstancias que afectan la variabilidad genética como la fragmentación, aislamiento, clonalidad y autopolinización (Soltis, 1987; Izquierdo, 1995; Tremblay & Ackerman, 2001; González-Astorga, 2004; Boisselier-Dubayle, 2009; del Castillo *et al.* 2013; Cascante-Marín, 2014).

Los valores de variabilidad genética, en epífitas, pueden explicarse por el hecho de crecer en un hábitat tan discontinuo y estresante como el dosel. Esto sugiere que dichas plantas están sujetas a grandes presiones de adaptación. Además su estructura metapoblacional, su dispersión tridimensional en el dosel (donde se reduce la distancia lineal entre los individuos), polinización por animales, sistema mixto de cruzamiento y dispersión de semillas por viento, son factores que aumentan la diversidad genética (Soltis, 1987; Zotz & Andrade, 2002; González-Astorga *et al.*, 2004; Flores - Palacios & García - Franco, 2006).

Queda claro que la diversidad genética de las especies determina su capacidad de respuesta al cambio, en epífitas, tener altos valores les garantiza mayor adaptación para enfrentar la alta variación ambiental característica del dosel. A su vez, la adaptación de sus características morfológicas y fisiológicas determina fuertemente sus patrones de composición, riqueza y abundancia (Andrade & Nobel 1997, Hietz & Briones 1998, Nieder *et al.* 2001, Krömer *et al.* 2007). Por lo tanto, entender la variabilidad genética de una especie nos garantiza una mejor base para establecer estrategias de conservación.

El énfasis de los estudios de diversidad genética de epífitas se ha enfocado en el mejoramiento de estrategias de conservación, se ha trabajado en hábitats fragmentados (Sarthou, 1990; González-Astorga, 2004; Boisselier-Dubayle, 2009; Cascante-Marín,

2014) y en la investigación de relaciones filogenéticas (Soltis, 1987; Izquierdo, 1995; Givnish & Barfuss, 2011) sin embargo hay un vacío en cuanto al estudio en poblaciones a diferentes altitudes.

Es sabido que la variación genética de las poblaciones en gradientes altitudinales varía. Las poblaciones periféricas son menos diversas que las poblaciones centrales. Esto es porque las poblaciones geográficamente centrales están bajo condiciones ambientales óptimas, mientras que las poblaciones periféricas están en situaciones más estresantes (Frankham *et al.*, 2002; Truang *et al.* 2007, Oshawa, 2008)

Además, evaluar la diversidad genética de una población en diferentes pisos altitudinales nos permite entender cómo responde una especie a diferentes presiones climáticas; estudiar la influencia de los pisos altitudinales de la montaña sobre la diferenciación genética permite considerar la importancia de las montañas para la estructuración genética y evolución de las especies (Taberlet *et al.*, 1998).

Tillandsia carlos-hankii es una bromelia epífita endémica de la Sierra Norte de Oaxaca, que se distribuye de los 1900 a los 2900 msnm. Esta especie está sometida a presiones antropogénicas derivadas del manejo forestal de su hábitat y la extracción para venta en mercados locales (Mondragón & Villa, 2008). Éste estudio busca explorar la relación entre su distribución en los diferentes pisos altitudinales con su riqueza alélica, así como la distribución de su diversidad genética, tanto entre individuos como entre poblaciones para entender las consecuencias de los posibles factores de amenaza sobre la persistencia de esta especie y preservar su potencial adaptativo.

Objetivos

General

Evaluar la diversidad genética intra e inter poblacional de *Tillandsia carlos-hankii* en diferentes pisos altitudinales.

Específicos

- Estimar la cantidad y la distribución de la diversidad genética dentro de las poblaciones.
- Estimar la cantidad y la distribución de la diversidad genética entre las poblaciones en los diferentes pisos altitudinales.
- Observar si hay estructura genética entre poblaciones.

Marco Teórico

Hábitat epífita

Zotz & Andrade (2002) definen una epífita como un organismo que vive sobre una planta o en los tejidos muertos del exterior de la planta, sin extraer agua o alimento de sus tejidos vivos. Una definición general hace referencia a toda planta autótrofa que germina sobre otra y no llega a establecer nunca contacto con el suelo. Sin embargo, el término epífita ha sido extendido a toda planta autótrofa que germine sobre otra o desarrolle la totalidad o parte de su ciclo sobre el árbol hospedero o forófito (Montaña *et al.*, 1997).

Las epífitas crecen en condiciones tan diversas como las que ofrece el mismo suelo del bosque. Por ejemplo, aquellas epífitas que se ubican en la corona de los árboles generalmente están sometidas a sequías pronunciadas, fuertes vientos, e irradiación intensa, mientras que aquellas que crecen en la base de los troncos gozan de mayor sombra por lo tanto mejores condiciones de humedad y temperatura (Gullison & Nissan, 1999; Zotz & Andrade, 2002). El dosel, conformado por las copas de los hospederos, representa un hábitat heterogéneo y muy difícil por los cambios microclimáticos, vientos, depredación e insolación. En respuesta a dichas condiciones, las epífitas vasculares han modificado su morfología y fisiología mediante el desarrollo de estructuras y estrategias especializadas como: rizomas, cutículas, succulencia, tricomas, disposiciones estructurales de las hojas, sistemas de reproducción mixta y síndromes de polinización, entre otros, que les han garantizado su éxito (Benzing, 1987; Gentry & Dodson, 1987; Matallana, 2003).

Gradiente altitudinal

Ha sido documentado el hecho de que la riqueza de especies disminuye al incrementarse la altitud, y que la mayor riqueza de especies epífitas se encuentra a altitudes intermedias (Kromer *et al.* 2005; Acebey & Kromer, 2008). Éste mismo patrón se observa en los valores de diversidad genética, los cuales siguen un patrón de joroba, en donde los valores

más bajos se reportan en las altitudes más altas y más bajas y los valores más altos en altitudes intermedias (Oshawa, 2008).

Oshawa (2008), en una revisión de 46 estudios de plantas terrestres, encontró evidencias de diferenciación altitudinal en el 70% de estos casos: basándose en mediciones de una serie de variables, incluyendo el tamaño del genoma, el número de cromosomas y un rango de loci utilizando marcadores moleculares. También observó que hubo una gran variación en los fenotipos entre las poblaciones a diferentes altitudes, al igual que Fernández-Ríos y colaboradores (2014) quienes documentaron la variación fenotípica en los caracteres florales de la bromelia epífita *Tillandsia carlos-hankii* en un gradiente altitudinal, donde se encontraron flores más grandes y con mayor número de óvulos a altitudes intermedias, lo cual debe estar impactando directamente su flujo y estructura genética.

No obstante, el patrón en forma de joroba es el más común tanto en ecosistemas tropicales como no tropicales, éste puede ser resultado de una combinación entre diversos factores no biológicos como: la intensidad del muestreo, el nivel taxonómico estudiado, el efecto del área estudiada, entre otros. El efecto del área que es dado por la forma de cono de las montañas hace que los cinturones altitudinales tengan áreas diferentes y generalmente presenten condiciones ecológicas diferentes, lo que lleva a las plantas a responder de manera disímil en cada sitio (Gentry & Dodson 1987; Benzing 1990; Rahbeck 1995). Las montañas pueden ser barreras genéticas de las especies que se distribuyen en las elevaciones más bajas, pero también pueden ofrecer accesos para las especies que ocupan hábitats de alta elevación (Taberlet *et al.*, 1998).

Kromer y colaboradores (2005) señalan que únicamente 12 de los inventarios locales que se han hecho en bosques montanos en América incluyen la distribución de epifitas vasculares a lo largo de gradientes altitudinales. En México la mayoría de los estudios sobre distribución de epifitas vasculares se han realizado en bosques tropicales y pocos se han enfocado en bosques templados y ninguno se ha enfocado en la variación de la diversidad genética de éste grupo de plantas a lo largo del gradiente.

La diversidad genética, entendida como la variedad de alelos y genotipos presentes en el genoma de una población y/o especies, las cuales pueden ser heredables, cuantificables e identificables, es el material en el que trabaja la evolución en poblaciones naturales y contribuye a la adaptabilidad de los individuos y les proporciona la capacidad de responder a factores, como parásitos, enfermedades, depredadores, cambios ambientales y antropogénicos (Hedrick, 2011).

El origen de la diversidad genética es multifactorial, pues es la suma de factores como: La historia de vida de la especie (sistema de reproducción, tamaño poblacional, dispersión), factores abióticos (humedad, radiación, suelo, entre otros) y factores bióticos (depredación, parasitismo, etc.) (Frankel & Soulé, 1981).

Sin embargo, la mutación es la única fuente de variación genética. Los cambios en la secuencia de nucleótidos ocurren como errores durante la replicación del ADN. Las mutaciones ocurren con una frecuencia baja y en el corto plazo su efecto no es apreciable, en el largo plazo es una fuerza muy importante porque es la fuente de toda la diversidad (Loó, 2011).

La selección natural y el flujo genético son fuerzas evolutivas que pueden aumentar o disminuir la diversidad genética. La selección natural es un mecanismo de reproducción diferencial de ciertos individuos (con determinados genotipos), sobre el resto de la población, bajo determinadas condiciones ambientales que prevalecen en un cierto momento del tiempo y espacio (Hedrick, 2011; Loó, 2011). Trabaja incrementando las frecuencias genotípicas de ciertos individuos de una población favoreciendo su sobrevivencia y mayor éxito reproductivo (adecuación). Una selección positiva promueve la diversidad, mientras que la selección negativa la elimina (Hedrick, 2011).

El flujo genético es la fuerza evolutiva en la que se incluyen todos los mecanismos resultantes de los movimientos de genes de una población a otra de una especie. En plantas este movimiento de genes está determinado por dos procesos: la dispersión de semillas y

ladispersión de polen (polinización).El efecto del flujo genético de una población a la otra promueve la diversidad, pero a la vez es una fuerza homogeneizadora, de esta manera se logra mantener los alelos presentes en varias poblaciones y poca diferenciación entre ellas; así, el flujo génico funciona como una fuerza evolutiva cohesiva evitando que las diferentes poblaciones sean demasiado diferentes (Eguiarte *et. al*, 2010).

Genética y conservación

Las actividades humanas imponen a las especies presiones selectivas mucho más intensas que las que se experimentan en escenarios naturales. La degradación y la contaminación ambiental, el cambio climático, la introducción de especies, la explotación, entre otros factores, imponen una serie de condiciones que muchas especies no han enfrentado anteriormente. La capacidad de las especies para poder confrontar dichas condiciones, está íntimamente ligada con la variabilidad genética que posean sus poblaciones. Según el teorema fundamental de la selección natural de Fisher (1930):

“La tasa de cambio evolutivo es directamente proporcional a la varianza genética aditiva del valor adaptativo de la población.”

Es decir, cuando se reduce la diversidad genética de una población, su potencial evolutivo disminuye; se reduce su capacidad de responder ante futuros retos ambientales. Por lo tanto, conservar la diversidad genética, entender la variabilidad adaptativa y la tolerancia de las especies a condiciones ambientales particulares, incrementará la probabilidad de éxito de cualquier iniciativa de restauración (Fisher, 1930).

Equilibrio de Hardy & Weinberg

La ley de equilibrio de Hardy & Weinberg, propuesta de manera independiente por G.W Hardy y W. Weinberg en 1908, enuncia la situación hipotética de una población cuya estructura genética no cambia con el tiempo. Es la hipótesis nula de la genética de

poblaciones al presentar las características de una población utópica cuyas frecuencias alélicas y genotípicas no están sometidas a las fuerzas evolutivas (Hedrick, 2011). Establece que en una población lo suficientemente grande o infinita, diploide, que se reproduce sexualmente, con apareamientos al azar entre individuos y que no se encuentra sometida a ninguna fuerza evolutiva en particular, las frecuencias genotípicas se mantendrán constantes de una generación a otra a lo largo del tiempo. (Klug *et al.*, 2006; Eguiarte, 2009).

Marcadores moleculares

La importancia de la metodología utilizada para estimar la diversidad genética, recae en la calidad de los datos resultantes dado que la información genética obtenida depende del tipo de técnica y las características de la molécula (ADN, proteínas) que se van a analizar. Es por ello que la gama de técnicas ha incrementado desde el estudio de movilidad de proteínas hasta los marcadores moleculares y amplificación de fragmentos específicos de ADN (Jiménez & Collada, 2000; Becerra & Paredes, 2003).

Los marcadores de ADN son los más utilizados en los estudios de genética de conservación ya que no se ven afectados por variaciones ambientales ni por la etapa de desarrollo de los individuos analizados, ya que se trabaja sobre la base misma de la variación de los individuos: el ADN (Müller-Starck & Schubert, 2000). Los marcadores nos permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios específicos, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado, permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no se manifiesta (Boscherini *et al.*, 1994; Paggi *et al.*, 2008).

Marcadores Moleculares *Inter Simple Sequence Repeats (ISSR's)*

Los ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats) son regiones en tándem con motivos de 2 a 4 nucleótidos complementarios a la secuencia de microsatélites. Se encuentran a lo largo de todo el genoma nuclear eucarionte y se localizan en secuencias no repetitivas del genoma (Zietkiewicz *et al.*, 1994; González & Aguirre, 2007).

Este tipo de marcadores amplifican por reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). La molécula generada con un tamaño o peso determinado se considera un locus que representa el segmento de ADN entre los microsatelites. Los ISSR's amplifican varias bandas en una sola reacción. Zietkiewicz *et al.*, (1994) menciona que pueden amplificar entre 25 y 50 bandas en una sola reacción, y que este patrón característico de bandeo se considera "huella digital genética" de cada uno de los individuos analizados.

Los ISSR's son marcadores dominantes por lo que se supone existen dos alelos por locus. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homócigo o heterócigo), mientras que su ausencia representa el genotipo homócigo recesivo. Su carácter de dominante puede ser considerado como una desventaja dado que no permiten el cálculo de ciertos estadísticos genéticos, como por ejemplo, la heterocigosidad observada (H_o) (González & Aguirre, 2007), sin embargo, la técnica de ISSR's ofrece diversas ventajas como: detectar la alta diversidad genética, su reproductibilidad, bajo costo, no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio, son sencillos de estandarizar, rápidos y eficientes.

Diversidad genética en bromelias

La rama de la genética que más se ha estudiado en bromelias es la filogenia, hay numerosos estudios que abordan su origen y especiación (por ej: Izquierdo, 1995; Givnish *et. al.*, 2010; Schulte & Barfuss, 2009, Escobedo-Sarti *et. al.*, 2013, entre otros) sin embargo, los estudios de diversidad genética son contados:

Soltis en 1987 y García-Morales en 2007 trabajaron la relación entre sistemas de reproducción y estructura genética de *Tillandsia ionanta* y *Tillandsia recurvata*, Murawski & Hamrick (1990) estimaron la diversidad genética de una especie clonal (*Aechmea magdalenae*), las consecuencias genéticas dadas por la fragmentación del hábitat en *Tillandsia achyrostachys* fue abordada por González-Astorga y en *Catopsis compacta* por del Castillo *et. al* (2013) (2004) y *Pictairnia geyskesii* fue estudiada por Boisselier-Dubayle (2009), la diferenciación de especies de los géneros *Alcantarea* y *Vriesea* causada por aislamiento fue documentada por Versieux (2012), las consecuencias del cambio climático en *Vriesea caucminis* fueron investigadas por Riberiro *et.al* (2013) y el primer estudio sobre la estructura genética a escala fina de una bromelia fue hecho por Cascante-Marín (2014) en *Guzmania monostachia*.

Las bromelias epífitas presentan una variabilidad genética de media a alta (Soltis, 1987; Izquierdo, 1995; González-Astorga, 2004; Boisselier-Dubayle, 2009; Versieux, 2012; del Castillo *et al.* 2013, Riberiro, 2013; Cascante-Marín, 2014). Dichos valores de variabilidad genética pueden explicarse por su historia de vida y por las ventajas adaptativas que les ha brindado el hecho de desarrollarse en el dosel. Las particularidades en su desarrollo impactan directamente en el patrón genético que presentan por que se relacionan directamente con las fuerzas evolutivas.

Por ejemplo, la distribución metapoblacional de las epífitas está estrechamente relacionada con los valores de diversidad genética; debido a los constantes eventos de colonización y extinción: si la población fundadora contiene pocos individuos, entonces será genéticamente pobre, pero varias poblaciones fundadoras y / o grandes, tendrán niveles de diversidad genética de equilibrada a alta y por lo tanto mayor calidad reproductiva (Ávila-Díaz & Oyama, 2007; Riberiro, 2013). Sin embargo, como observaron González-Astorga (2004) en *Tillandsia achyrostachys* y Cascante-Marín (2014) en *Guzmania monostachia*, mantener una diversidad genética total equilibrada, en poblaciones fragmentadas y pequeñas, depende del aumento en el flujo de genes entre los nuevos fragmentos de las poblaciones recién derivadas y no de los efectos fundadores y de colonización (Hewitt 1999, Hedrick 2005, Zenger *et. al* 2003).

La dispersión de semillas y polen es fundamental para asegurar un buen flujo genético entre poblaciones (Eguiarte *et. al.* 2006). Linhart y colaboradores (1987) señalan que la eficiencia de los polinizadores puede influenciar la estructura genética de las poblaciones vegetales. Las especies de bromelias epífitas, al ser polinizadas en su mayoría por colibrís, los cuales pueden volar varios kilómetros, aumentan el flujo genético ya que transportan genomas de individuos de diferentes poblaciones entre sí (Carranza-Quinceno, 2008). Además, al ser dispersadas por viento pueden alcanzar a diseminarse a largas distancias, permitiendo el flujo de genotipos entre poblaciones lejanas. Sin embargo, las condiciones geográficas intervienen en las distancias a las que el viento puede dispersar el polen y las semillas (Carranza & Estévez 2008, Boysselier-Dubayle. 2013; Cascante-Marín. 2014).

Los estudios de diversidad genética en bromelias epífitas ponen de manifiesto que la capacidad de los individuos para responder a los cambios ambientales está en sus genes. A pesar de desarrollarse en circunstancias que afectan la variabilidad genética (fragmentación, aislamiento, clonalidad, autopolinización) las bromelias generalmente presentan valores de medios a altos debido a que se han sobrepuesto a tales desventajas. Al traducir éstas características a su historia evolutiva es notorio cuales son las fuerzas evolutivas operantes en su desarrollo y por lo tanto mantenido. Por ejemplo, la selección natural adapta a cada uno de los individuos y poblaciones a sus condiciones locales, diferenciándolas entre sí, a través del movimiento de genes entre las poblaciones se evita su diferenciación por aislamiento; por lo que los síndromes de polinización, semillas aladas y ligeras para la dispersión a larga distancia ha sido mantenida y perfeccionada. (Hedrick, 2005; Eguiarte, 2009; González-Astorga, 2004).

En cuanto al sistema de reproducción mixto, la fecundación cruzada, disminuyen el desperdicio del polen y evitan los efectos negativos de la endogamia. Los múltiples diseños florales influyen de manera directa en la frecuencia con la que se unen los gametos de los individuos no emparentados para formar un cigoto genéticamente saludable (Barret, 2003).

Materiales y Métodos

Especie de estudio: *Tillandsia carlos-hankii* Matuda (Fig.1)



Fig. 1 Planta adulta de *Tillandsia carlos-hankii* Matuda

Bromelia epífita monocárpica, hermafrodita. Mide de 57 a 70 cm de altura, con hojas rígidas y dispuestas en roseta densa (tanque) que puede almacenar hasta 1.4 L de agua. El escapo es robusto con brácteas imbricadas, de color verde, en la parte baja y rojas en el tercio superior. La inflorescencia es densa y angostamente cilíndrica, las brácteas primarias inferiores son más grandes que las superiores, las vainas foliares son ovadas, pardo-oscuro y lustrosas; las láminas foliares son de hasta 1.5 cm de ancho. Las espigas son cortas y estipitadas con pedúnculo de 0.6 mm de largo.

Las brácteas florales son triangulares de 2.5×1.2 cm, densamente lepidotas. Las flores dispuestas en espigas presentan sépalos lanceolados y pétalos tubulares verde pálido de 5.2 a 5.7 cm de largo. Los frutos son cápsulas con semillas pequeñas con apéndices plumosos (Smith & Downs, 1977; Espejo-Serna *et al.* 2004; López-Ferrari & Espejo-Serna, 2007). *Tillandsia carlos-hankii* es una especie cuyas flores sugieren un síndrome de polinización por troquilofilia (colibrís), en tanto que la dispersión de semillas es anemócora (viento).

Fernández-Ríos y colaboradores (2014) documentaron la variación fenotípica en los caracteres florales de esta bromelia en un gradiente altitudinal, encontrando una mayor

variación interpoblacional que a nivel intrapoblacional en el tamaño de las flores (las flores más grandes y con mayor número de óvulos se encontraron a altitudes medias); sin embargo, se presentó una asincronía en la floración entre poblaciones.

Tillandsia carlos-hankii es endémica de Oaxaca, de las regiones de Cañada, Mixteca, Sierra Sur y Sierra Norte del estado. Crece en bosques de pino-encino a altitudes que van de los 1900 hasta los 2900 msnm. Actualmente está catalogada como una especie amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Espejo-Serna *et al.* 2004, 2007, SEMARNAT 2014). A pesar de su status en la norma, algunas de sus poblaciones están bajo presiones antrópicas como la extracción y la tala de sus hospederos (Mondragón & Villa-Guzmán, 2008).

Área de estudio

El bosque de pino-encino se localiza en el municipio de Santa Catarina Ixtepeji, en la Sierra Norte de Oaxaca, en altitudes que van desde los 2200 a los 2700 msnm, entre 96° 36' a 96° 39' Longitud Oeste de 17° 09' a 17° 11' Latitud Norte (Fig.2). El clima de la zona oscila de templado a frío subhúmedo (García, 1988), con una temperatura media anual de 18.3 °C y 772.3 mm de precipitación anual (Servicio Meteorológico Nacional, 2011). La vegetación arbórea y arbustiva predominante está compuesta por *Quercus obtusata*, *Q. aff. laurina*, *Q. crassifolia*, *Pinus pseudostrobus*, *Abies hickelli*, *Arbutus xalapensis*, *Cornus disciflora* (Zacararias-Eslava & del Castillo 2010). Las plantas epífitas presentes son: *Tillandsia prodigiosa*, *T. macdougali*, *T. violaceae*, *Peperomia aff. galioides*, *Pleopeltis polylepis* y *Polypodium madreense* (Victoria, 2009).

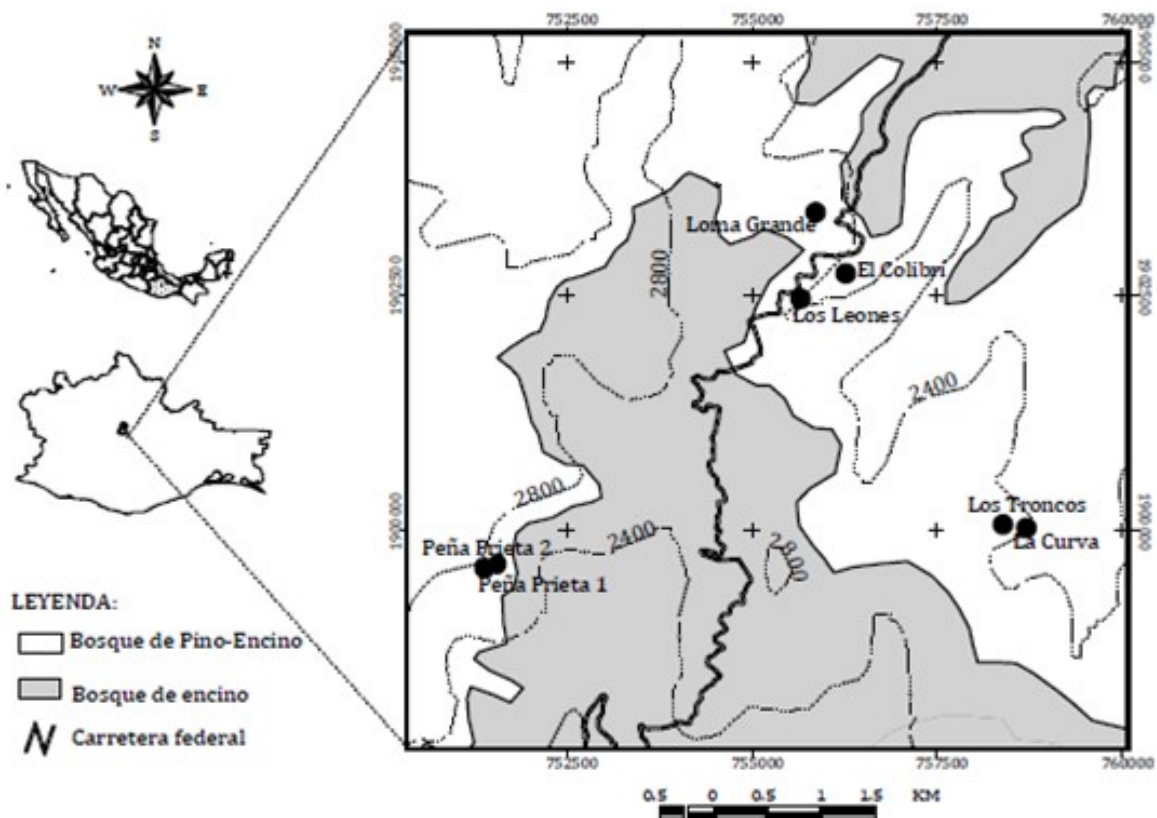


Fig. 2 Mapa de localización para las 7 poblaciones de *T. carlos-hankii* en los bosques de Santa Catarina, Ixtepeji retomadas para este estudio.

Colecta de material vegetal

Se retomaron siete de los ocho sitios muestreados por Fernández-Ríos (2014) en su estudio de análisis de variación fenotípica en *T. carlos-hankii* (Cuadro 1). Los sitios se encuentran localizados en un gradiente altitudinal de 2400 a 2788 msnm, con una separación mínima de 0.14 km y máxima de 7.28 km.

En cada sitio se seleccionaron 25 individuos adultos de *T. carlos-hankii* creciendo en diferentes árboles (N=175). De cada individuo se colectaron 3-5 hojas enteras y sanas. Los cuales se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético para ser almacenadas en una hielera y transportadas al Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Universidad de la Sierra Juárez donde se congelaron a -20°C hasta el momento de la extracción.

CUADRO 1. Algunas características demográficas de las poblaciones de *Tillandsia carlos-hankii* y parámetros ambientales de los sitios donde crecen. Tomado de Fernández-Ríos y colaboradores

Variables descriptivas (muestreo de 300 m ²)	Nombre local del sitio (altitud en m snm)						
	El Colibrí (2428)	Los Leones (2509)	La Curva (2513)	Los Troncos (2560)	Loma Grande (2615)	Peña Prieta 2 (2732)	Peña Prieta 1 (2788)
Poblaciones de <i>T. carlos-hankii</i> :							
a) Porcentaje de forofitos ocupados por <i>T. carlos-hankii</i>	95.8	59	76.9	70	97.6	61.9	37.5
b) Núm. individuos reproductivos.	5	10	14	3	8	8	17
c) Núm. indiv. dispersando semillas	24	27	12	4	11	3	3
Especies de bromelias concurrentes en el sitio	<i>T. macdougalli</i> , <i>T. prodigiosa</i> y <i>T. usneoides</i>	—	—	—	<i>T. macdougalli</i>	<i>T. prodigiosa</i> y <i>T. violacea</i>	<i>T. macdougalli</i> , <i>T. violácea</i> , <i>T. oaxacana</i> y <i>T. quaquaflorifera</i>
Precipitación media anual (mm)	861.4	889.8	891.2	907.7	927.0	968.1	987.7
Temperatura media anual (°C)	15.7	15.1	15.1	14.8	14.4	13.6	13.2
Temperatura media anual mín. (°C)	9.0	8.7	8.6	8.4	8.2	7.6	7.4
Número de árboles y arbustos	24	22	13	30	42	21	24
Densidad árboles y arbustos/m ²	0.08	0.07	0.04	0.10	0.14	0.07	0.08
Diámetro de árboles a 1.30 m (cm)	21.6 ± 10.9	26 ± 12.0	31.4 ± 22.1	20 ± 14.4	15.5 ± 9.0	28.5 ± 15.7	29.1 ± 15.0
Cobertura de copa (m)	6.8 ± 2.9	6.7 ± 3.5	11.8 ± 9.2	5.7 ± 3.7	4.2 ± 2.1	5.9 ± 2.5	7.1 ± 4.46
Altura de árboles (m)	13.1 ± 4.3	13.5 ± 6.1	12.2 ± 6.7	12.3 ± 5.3	6.1 ± 2.1	8.7 ± 3.2	8.7 ± 3.8
Vegetación predominante por género y porcentaje de abundancia	<i>Quercus</i> (20.8%) y <i>Pinus</i> (79.2%)	<i>Quercus</i> (27.3%), <i>Pinus</i> (63.6%) y <i>Arbutus</i> (9.1%)	<i>Quercus</i> (61.5%), <i>Pinus</i> (30.8%) y <i>Arbutus</i> (7.7%)	<i>Quercus</i> (40.0%), <i>Pinus</i> (43.3%), <i>Arbutus</i> (6.7%) y <i>Myrsine</i> (10.0%)	<i>Quercus</i> (92.9%), <i>Pinus</i> (2.4%) y <i>Arbutus</i> (4.8%)	<i>Quercus</i> (81.0%), <i>Pinus</i> (4.8%) y <i>Arbutus</i> (14.3%)	<i>Quercus</i> (62.5%), <i>Pinus</i> (16.7%), <i>Arbutus</i> (4.2%), <i>Laurel</i> (4.2%) y <i>Yucca</i> (12.5%)
Actividades de perturbación del hombre	Extracción de leña, manejo forestal, colecta de bromelias	Extracción de leña, manejo forestal, colecta de bromelias	Manejo forestal	Zona de manejo forestal	Zona de cultivo, manejo forestal, colecta de <i>T. carlos-hankii</i> , extracción de resina y leña	Zona de conservación comunal	Zona de conservación comunal

A partir de datos meteorológicos Fernández-Ríos y colaboradores (2014) estimaron un descenso de 0.7 °C en la temperatura y un incremento de 35.1 mm en precipitación de las medias anuales respectivamente por cada 100 m de incremento en altitud.

Trabajo de laboratorio

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de *T. carlos-hankii* siguiendo el protocolo **DNeasyPlant Kit Qiagen** con dos modificaciones: Se aumentó la cantidad de tejido de 80 a 100 mg lo que generó una solución más pastosa, por lo que a los tiempos de centrifugación se aumentaron de 3 a 5 minutos para lograr mejor calidad en el sobrenadante.

Protocolo de Extracción de ADN por el método DNeasyPlant Kit (QIAGEN) utilizado para el análisis de las muestras

1. Cortar en cuadros pequeños las hojas de *Tillandsia carlos-hankii* y molerlos con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y transferir 100 mg del polvo a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar 400 µl de la solución AP1 y 2 µl de RNasa A al tubo eppendorf. Agitar con vórtex por 10 segundos e incubar a 65° C durante 10 minutos. Agitar 2 o 3 veces durante la incubación.
3. Agregar 130 µl de la solución AP2 e incubar por 5 minutos en hielo.
4. Centrifugar por 18 minutos a 14000 rpm.
5. Transferir el sobrenadante a la columna lila (shedder).
6. Recuperar el filtrado y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml, cuidando de no tomar parte de la pastilla de filtrado (Se obtienen 450 µl de filtrado aproximadamente).
7. Agregar 1.5 volúmenes de la solución APE3 (binding buffer) al tubo eppendorf (aproximadamente 625 µl) e invertir varias veces.
8. Agregar 750 µl de la mezcla a la columna blanca y centrifugar durante 3 minutos a 8000 rpm, y decantar el filtrado.
9. Agregar el resto de la mezcla a la columna blanca y centrifugar durante 3 minutos a 8000 rpm. Decantar el filtrado.
10. Agregar 500 µl de la solución AW a la columna blanca y centrifugar 1 minuto a 8000 rpm. Para el lavado de ADN.
11. Agregar 500 µl de la solución AW a la columna blanca y centrifugar durante 2 minutos a 14000 rpm. Para secar la membrana.
12. Transferir la columna blanca a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
13. Agregar 50 µl de la solución AE preincubada a 65° C e incubar 5 min y centrifugar 1 minuto a 8000 rpm para eluir el ADN.
14. Repetir paso anterior y almacenar a -20° C.

Para comprobar que el protocolo de extracción se aplicó de forma adecuada, es decir que hubo presencia y calidad en el ADN extraído, se realizaron electroforesis en geles de

agarosa al 1% en medio TBE 0.5X + BrET (bromuro de etidio) (0.005 mg/ml) durante un promedio de 40 min a 110 v (Fig. 3). Los geles resultantes se visualizaron mediante luz UV en un equipo transiluminador (marcaAlphaImager) con el software Alpha EASE v 6.0.0 (AlphaInnotechCorporation, 1993-2006).

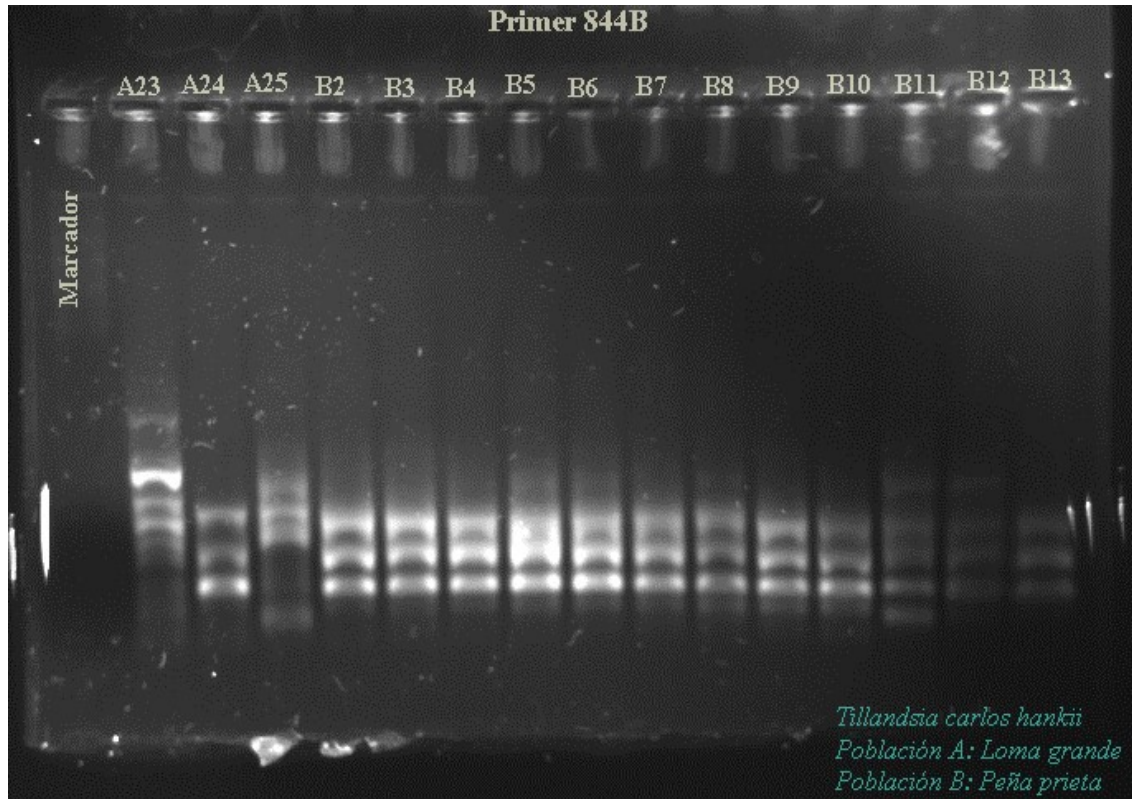


Fig. 3 Visualización del gel de agarosa al 1 % con tinción de bromuro de etidio (0.005 mg/ml).

Estandarización de los ISSR's

Se probaron diferentes oligonucleótidos obtenidos de la base de datos de la Universidad de British Columbia, se optó por seleccionar 15 ya que han sido lo más recomendados para plantas y se probaron en cinco individuos de cada población muestreada (siete poblaciones, 35 individuos en total). Posteriormente se seleccionaron 9 oligonucleótidos, eligiendo aquellos que presentaron el mayor número de polimorfismo y un alto grado de repetitividad de acuerdo a Wolfe *et al.*, (1998) <http://www.biosci.ohiostate.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html> (Cuadro 2). En el cuadro 3 se muestran las concentraciones y reactivos utilizados en el PCR de los ISSR's usados en *T. carlos-hankii*.

CUADRO 2. Secuencias de bases nitrogenadas para los ISSR's seleccionados para la replicación de ADN de *Tillandsia carlos-hankii*

	Oligonucleótido	Secuencia	# de bandas
1	814	CTC TCT CTC TCT CTC TTG	9
2	17899A	GTC GTCGTC GC	15
3	17899B	CAC ACA CAC AGA AC	14
4	17899B-1	GAG AGA GAG AGA GG	13
5	844A	CTC TCT CTC TCT CTC TAG	12
6	844B	CTC TCT CTC TCT CTC TGC	10
7	HB10	GAG AGA GAG AGA CC	10
8	HB14	CTC CTCCTC GC	11
9	HB15	GTC GTCGTC GC	11

CUADRO 3. Reactivos y concentraciones utilizados en cada mezcla (15 µl) para la amplificación (PCR) de los ISSR's en *Tillandsia carlos-hankii*.

Reactivos	Volumen	(Final)
H ₂ O estéril	8.4 µl	15 µl
BSA	1.5 µl	
Master Stock*	3.04 µl	
Oligonucleótido (primer)	0.8 µl	
<i>Taq</i> polymerase (Invitrogen™)	0.18µl	
ADN molde	1.08µl	

*MasterStock= agua purificada, Buffer-Invitrogen (pH08.4), MgCl₂1M y 0.1mM de DNTPS -Invitrogen.

El programa de PCR más exitoso al probar los oligonucleótidos consistió en: una temperatura inicial de 94° C, durante cinco minutos (desnaturalización), seguido de 44 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 37°C durante un minuto (alineación), 30 segundos a 54°C, dos minutos a 72°C (extensión) y una extensión final de 13 minutos para que la alineación sea mayor y obtener mayor cantidad de ADN. La molécula obtenida con esta técnica se separó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron como bandas con luz ultravioleta.

Lectura de geles

Lo que se observa en las fotografías de los geles es la ausencia o presencia de una banda de cierto peso molecular (Fig.4). Los ISSR's son marcadores dominantes, lo que significa que no se pueden distinguir entre homocigotos dominantes y heterocigotos. Cada letra corresponde a una población y cada número corresponde a un individuo, las bandas observadas en cada fila corresponden a un gen conformado por una molécula de ADN de cierto peso, por lo tanto cada columna de bandas se interpreta como los loci de este gen, la repetición de bandas por cada fila se interpreta como la cantidad de variantes que tiene un gen por locus.

Para el análisis de datos se construyen matrices binarias con respecto a la presencia o ausencia de las bandas por cada loci, es decir, 0 cuando no se presenta la banda y 1 cuando es observable.

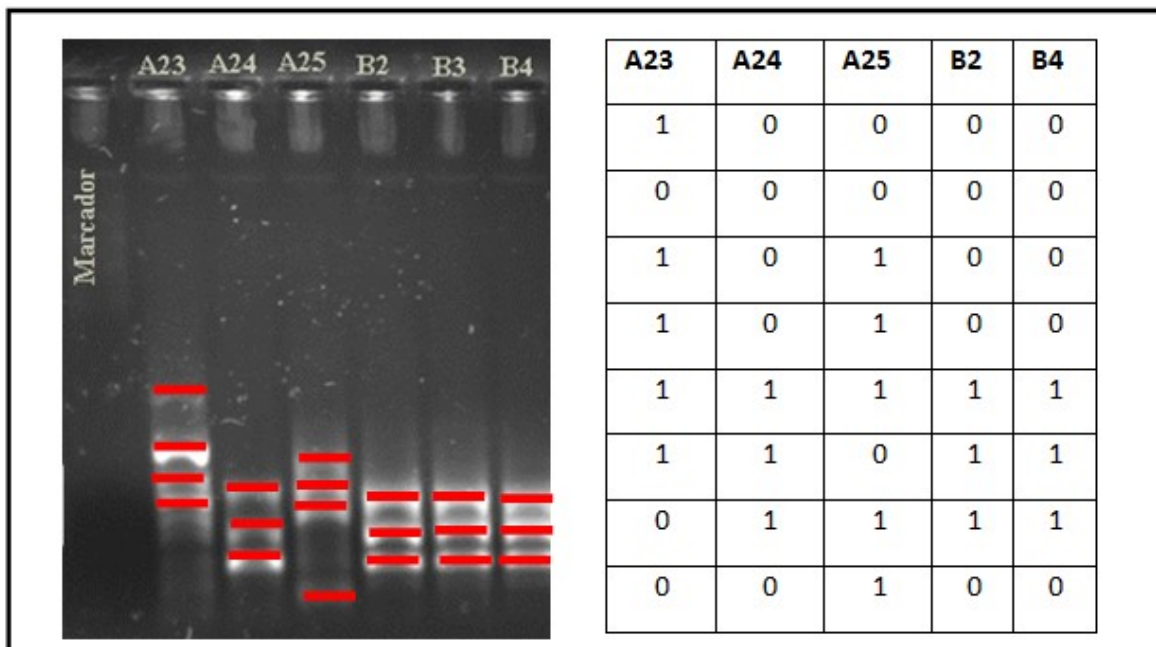


Fig. 4 Ejemplo de construcción de matrices de incidencia a partir de la visualización en geles de agarosa. Cada línea vista en el gel se transcribe como 1 dentro de la matriz.

Análisis de datos

Por medio del programa GenAlex v6.501 se determinó el número de bandas observadas (I_o), y exclusivas (I_e) por población. Con el programa TFPGA se aplicó la prueba de diferenciación exacta (Raymond & Rousset, 1995) para determinar si existían diferencias significativas entre las frecuencias alélicas observadas entre las poblaciones. Para detectar diferencias estadísticas significativas dentro y entre las siete poblaciones se utilizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), con este método se realizaron correlaciones de la diversidad haplotípica en diferentes niveles jerárquicos basado en el uso de matrices de distancia genética; repartiendo la varianza entre y dentro de los grupos predefinidos.

El flujo genético fue calculado con la fórmula de Crow & Aoki (1984):

$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{\Phi_{st}} - 1\right)}{4\alpha} \quad \alpha = \left(\frac{n}{n-1}\right)^2$$

Donde n es el número total de poblaciones, y Φ es el valor promedio de diferenciación genética.

Mediante un análisis de agrupamiento (clúster análisis) se usó el estimador de similitud de distancias genéticas de Nei (1978), el cual pretende estimar el número de mutaciones que a nivel nucleotídico se han acumulado en las secuencias de dos grupos a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original. Se obtuvo un fenograma con el fin de visualizar mejor las relaciones genéticas entre todas las poblaciones.

Para reconocer si *Tillandsia carlos-hankii* sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir, si existe una correlación entre altitud, las distancias geográficas y las distancias genéticas entre pares de poblaciones, se aplicó la prueba de Mantel, donde si existe una correlación positiva significativa entre la distancia geográfica y la genética, significa que el flujo génico es limitado y localizado, lo cual origina que las poblaciones más cercanas en el espacio sean más cercanas y tengan más flujo génico que las más alejadas.

Resultados

Análisis genéticos

Diversidad Alélica

En promedio se obtuvieron: $I_o=102.7 \pm 3.5$ bandas polimórficas claramente detectables y reproducibles mediante el programa GenAlex v6.501, no se encontraron bandas únicas.

Diversidad genética

Los promedios totales para las siete poblaciones fueron: heterocigosidad esperada $H_e=0.386 \pm 0.003$, en el supuesto que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy- Weinberg. El porcentaje de loci polimórficos ($\%P=87.98 \pm 1.17$) y el Índice Shannon ($I=0.451 \pm 0.004$) pueden observarse en el Cuadro 4. La población de *T. carlos-hankii* que presentó el valor más alto de heterocigosidad esperada e índice de Shannon fue Loma Grande ($H_e=0.412 \pm 0.005$; $I=0.538 \pm 0.005$), mientras que el valor más bajo se encontró en la población de La Curva ($H_e=0.318 \pm 0.004$; $I=0.325 \pm 0.018$).

Cuadro 4. Valores de diversidad genética para las 7 poblaciones de *T. carlos-hankii*

Altitud (msnm)	Población	N	I	He	%
2788	Peña Prieta I	25	0.503	0.402	100%
2732	Peña Prieta II	25	0.541	0.407	95.83%
2615	Loma Grande	25	0.538	0.412	100%
2560	Los Troncos	25	0.470	0.391	91.67%
2513	La Curva	25	0.325	0.318	66.87%
2509	Los Leones	25	0.388	0.389	90.67%
2428	El Colibrí	25	0.391	0.367	70.83%
PROMEDIO			0.451	0.386	87.98%

N= número de individuos muestreados

I=índice de diversidad de Shannon

He= heterocigosidad observada

%= Porcentaje de loci polimórfico

Los valores más altos de loci polimórficos los encontramos en las poblaciones de Peña Prieta I y Loma Grande ($\%P=100$) mientras que los más bajos correspondieron a la población de La Curva ($\%P=66.87$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas entre las poblaciones evaluadas.

Estructura genética poblacional y flujo genético

Los resultados del AMOVA mostraron que el 83% de la diversidad genética se encontró dentro de las poblaciones (83 % $P < 0,001$), mientras que la variación entre las poblaciones fue del 17 % $P < 0,001$ (Tabla 5). El índice de fijación poblacional fue $F_{st}=0.77 \pm 0.18$ y el flujo génico fue de $Nm=2.25$.

CUADRO 5. Valores del AMOVA para las 7 poblaciones de *T. carlos-hankii*

Fuente	N	Suma de cuadrados	Cuadrados promedio	Componente de la varianza	% de la varianza total
Entre poblaciones	7	138.514	23.086	0.771	17%
Dentro de poblaciones	175	640.320	3.811	3.811	83%
Total		778.834		4.582	100%

Relaciones genéticas entre poblaciones

De acuerdo al análisis de agrupamiento (Cuadro. 6) se observó que los sitios que comprenden las poblaciones a mayor altitud de Peña Prieta I, Peña prieta II y Loma Grande son más cercanos genéticamente que las poblaciones que conforman el segundo grupo, El Colibrí, Los Troncos, La Curva y Los Leones que a su vez se estratifican en 2 subgrupos.

CUADRO 6. Matriz de distancias genéticas de Nei estimados entre pares de poblaciones

	Loma Grande	Peña Prieta I	Peña Prieta II	Los Troncos	Los Leones	La Curva	El Colibrí
Loma Grande	0.000	0.077	0.087	0.089	0.076	0.122	0.117
Peña Prieta I	0.077	0.000	0.097	0.126	0.154	0.196	0.147
Peña Prieta II	0.087	0.097	0.000	0.116	0.113	0.169	0.105
Los Troncos	0.089	0.126	0.116	0.000	0.137	0.166	0.072
Los Leones	0.076	0.154	0.113	0.137	0.000	0.044	0.114
La Curva	0.122	0.196	0.169	0.166	0.044	0.000	0.109
El Colibrí	0.117	0.147	0.105	0.072	0.114	0.109	0.000

Lo cual se aprecia más claramente en el dendrograma (Fig.5), en donde se observa la formación de los tres grupos anteriormente mencionados. La línea punteada indica la primer separación en 2 grandes grupos por afinidad genética: Peña Prieta I, Peña Prieta II , Loma Grande, El Colibrí y Los Troncos separadas de La Curva y Los Leones.

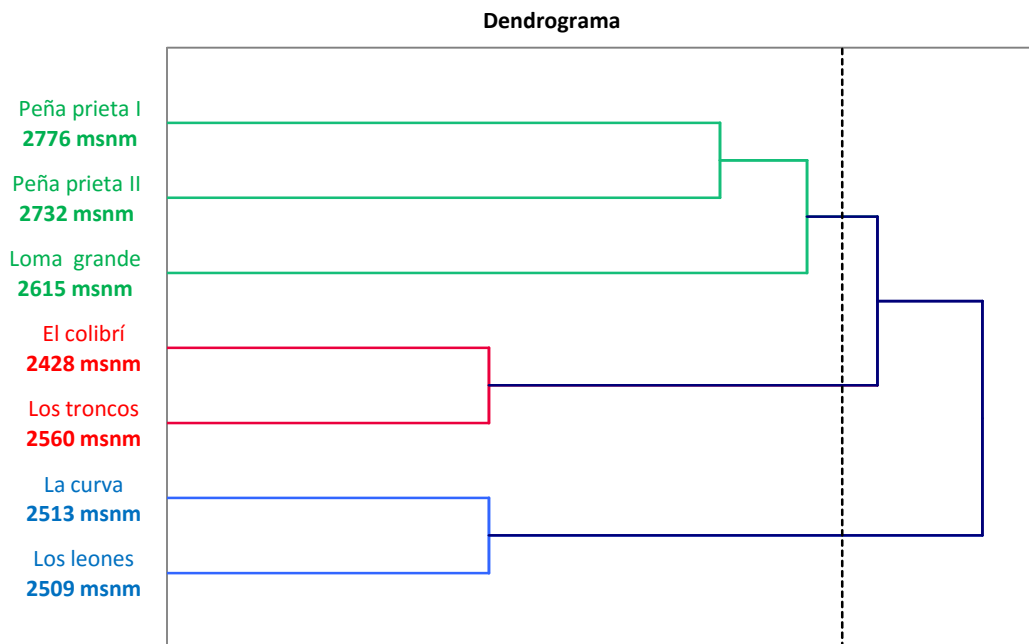


Fig.5 Dendrograma estimado por (Unweighted Pair Group Method using Weinberg Arithmetic averages) para las 7 poblaciones de *T. carlos-hankii* .Se consideró en equilibrio de Hardy-Weinberg y se usó el método de distancias genéticas Nei (1978) con 10000 remuestreos.

De acuerdo con la prueba de Mantel, la relación entre la distancia que separa las poblaciones y su distancia genética es muy baja ($p=0.0349 < \alpha=0.05$), sin embargo es estadísticamente significativa. A mayor distancia geográfica las poblaciones difieren más entre sí. No hay una correlación entre altitud y distancia genética dado que $p=0.268 > \alpha=0.05$, a pesar de encontrar los valores de diversidad genética más altos en el extremo superior del gradiente, no sucede lo mismo con las poblaciones del extremo inferior, la población El Colibrí es la que se encuentra en el extremo inferior del gradiente y es La Curva quien presenta los valores de diversidad genética más bajos.

Si bien no hay correlación, si se observa una tendencia estadísticamente no significativa, de que a mayor altitud las poblaciones reportan mayor diversidad genética (Fig. 6).

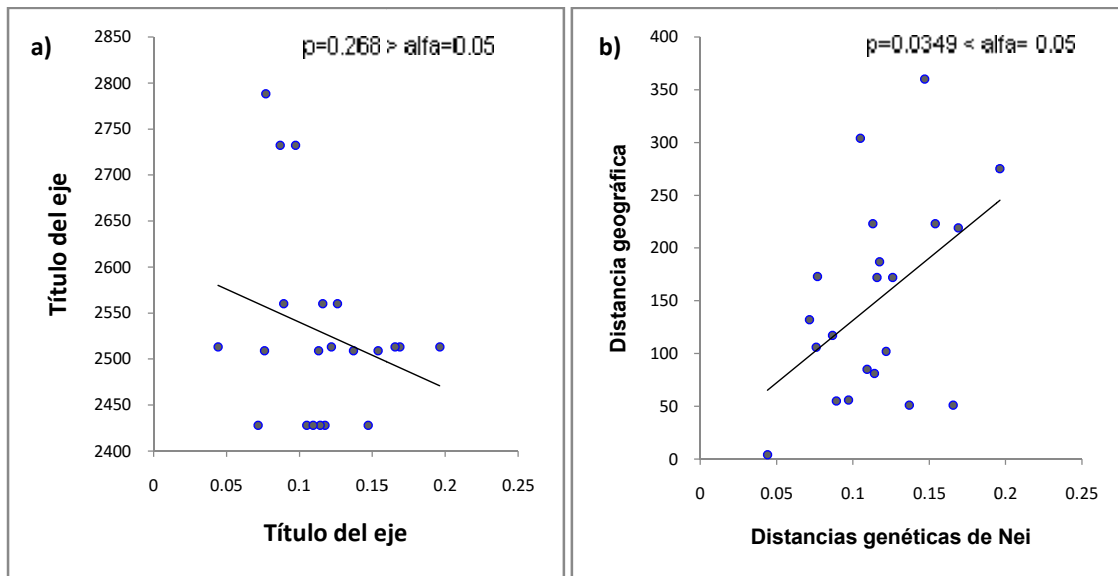


Fig. 6 Prueba bilateral de Mantel utilizando la distribución de $r(AB)$ estimada a partir de 10000 permutaciones. Gráficos de dispersión y líneas de tendencia por pares de poblaciones sobre altitud (a) y distancias geográficas (b).

Discusión

Diversidad inter poblacional:

Tillandsia carlos-hankii presenta el porcentaje de varianza entre poblaciones más bajo dentro de los estudios de diversidad genética en bromelias epífitas (17%), Murawski & Hamrick (1990) reportaron un 33% de diferenciación entre 9 poblaciones de *Aechmea magdalenae*, en contraste, González-Astorga (2004) encontró el valor más alto de variación con un 40% de diferenciación entre 6 poblaciones de *T. achyrostachys*.

Cabe señalar que las bromelias *T. recurvata*, *Aechmea magdalenae* son especies autogamas y la autogamia junto con un bajo flujo génico, promueve diferenciación entre poblaciones. Caso opuesto a *T. carlos-hankii*, que de acuerdo a Mondragón & Ramirez (2008) exhibe sistemas mixtos de cruzamiento, lo que según Barret (2003) disminuye el desperdicio de polen y evitan los efectos negativos de la endogamia.

Los individuos producto de fecundación cruzada tiene las ventajas de la recombinación (mayor variación genética), y los que son producto de autofertilización aseguran el mantenimiento del genotipo parental, el cual generalmente se encuentra bien adaptado a las condiciones ecológicas prevalecientes (Lande, 1985; Barret y Eckert, 1990).

Además al ser polinizada por colibríes el flujo genético aumenta ($Nm=2.25$) ya que en el área de distribución de *T. carlos-hankii* se encuentran 30 especies de colibríes con rangos de vuelo que van de 30 a 2000 metros (Binford, 1989). En conjunción con esto, Fernández-Ríos y colaboradores (2014) reportan un periodo de 13 semanas de sincronía floral entre todas las poblaciones estudiadas, lo que facilita la probabilidad de recombinación de diferentes genotipos provenientes de prácticamente cualquier población. Asimismo la anemocoria está considerada como una de las formas de dispersión donde se alcanzan las mayores distancias de dispersión (Augusper 1983, Benzing 1990), lo que favorece el flujo génico entre poblaciones; este conjunto de factores pudieran explicar la baja variabilidad (17%) interpoblacional de *T. carlos-hankii*.

Diversidad intrapoblacional

Los valores promedio en el porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad esperada e índice de Shannon encontrados en este estudio para *T. carlos-hankii*, muestran una variabilidad genética de media a alta, dentro de cada una de las poblaciones estudiadas, de acuerdo con lo reportado en otras especies de bromelias epífitas (Soltis, 1989; Izquierdo, 1995; Sarthou, 1990; González-Astorga, 2004; Boisselier-Dubayle, 2009). Del Castillo y colaboradores (2013) encontraron el valor de heterocigosidad esperada más alto dentro de los estudios de diversidad genética en bromelias ($He=0.399$) en *Catopsis compacta*. Por el contrario, Soltis (1987) en *Tillandsia ionantha* y *T. recurvata*, reporta el valor más bajo ($He=0.010$) con ausencia total de heterocigotos.

Dentro de los estudios antes mencionados *T. carlos-hankii* se ubica en segundo lugar con valores de diversidad alélica ($I_o=102.7 \pm 3.5$) y genética ($He=0.386$; $I=0.451$). En el sitio de Loma Grande se reporta el valor más alto de diversidad genética ($He=0.442$, $I=0.63$ y 100% de loci polimórficos) y es donde se encuentran los árboles más colonizados, además

podemos inferir que hay un buen flujo de genes entre árboles del sitio ya que no hay estructuración a nivel intrapoblacional.

La alta diversidad dentro de las poblaciones y baja diferenciación genética se han atribuido a: 1) tamaño efectivo grande de la población (Ávila-Díaz, 2014), 2) sistema de entrecruzamiento (Hedrick, 2011), 3) fragmentación histórica de una distribución que alguna vez fue continua (poblaciones cercanas entre sí geográficamente) 4) polinización y dispersión efectivas, dado que es a través de dichas estrategias que se mueven y fijan genes a través del espacio y tiempo promoviendo la diversidad y manteniendo alelos presentes en varias poblaciones para mantener baja la diferenciación intrapoblacional (Hedrick, 2011). (Boisselier-Dubayle, 2010; Izquierdo, 1995; González-Astorga, 2044).

Estructura genética y relaciones genéticas entre poblaciones.

Fernández-Ríos y colaboradores (2014) han documentado la variación fenotípica en los caracteres florales de *T. carlos-hankii* en diferentes pisos altitudinales registrando un cambio notorio en los tamaños de flores y producción de óvulos en relación a la altitud. A menor altitud mayor número de óvulos, lo cual se atribuyó a los cambios ambientales entre pisos altitudinales al generar variación y divergencia fenotípica. Contrario a lo obtenido en este estudio en cuanto a diversidad genética, ya que las poblaciones establecidas a mayor altitud (Peña Prieta I, Peña Prieta II y Loma Grande) presentan los valores de diversidad genética más altos. De igual forma difieren los niveles de variación inter e intra poblacional, en el estudio de Fernández-Ríos y colaboradores (2014) se reporta mayor variación entre poblaciones que a nivel intrapoblacional.

Las condiciones óptimas para la especie a nivel fenotípico se dan entre los 2153 a 2615 msnm donde la temperatura mínima varía de 8.2 a 8.6 °C y la precipitación media anual oscila entre 291.2 a 927.0 mm; sin embargo, los valores de diversidad genética de las poblaciones establecidas en este rango (Los leones y El colibrí) son las que exhiben los valores más bajos ($H_e = 0.389$ y $H_e = 0.367$ respectivamente) aunque, en general, son valores medios.

Las condiciones orográficas, altitudinales y ambientales (nichos), que determinan la incidencia de luz, temperatura y humedad, ejercen diferentes presiones de selección natural sobre las poblaciones de *T. carlos-hankii*. Además, las plantas de *T. carlos-hankii* se establecen en diferentes estratos de altura de los árboles, y también esas condiciones micro-ambientales y nutricionales influyen en la variación tanto fenotípica como genotípica (Johansson, 1974).

La caracterización floral y la diversidad genética pueden considerarse como estimadores del efecto ambiental, las diferencias dadas dentro de las poblaciones indican que el nicho altitudinal de la población afecta la expresión de botones y flores así como su diversidad genética, la cual se mantiene en un buen nivel por el buen flujo genético a nivel regional.

De acuerdo con el análisis de agrupamiento (Fig.5), las poblaciones se dividen en tres grupos, sin embargo se anidan en 2 a partir del primer nodo, así, se separan Peña prieta I, Peña prieta II y Loma grande, que representan el extremo superior altitudinal, de El colibrí, Los leones, Los troncos y La curva, que representan el extremo inferior y la media del gradiente altitudinal. Esto significa que en realidad las poblaciones establecidas a mayor altitud son las que se diferencian de las restantes, no hay una tendencia gradual que relacione los pisos altitudinales con la diversidad genética, sin embargo, el test de Mantel revela correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas entre pares de poblaciones, es decir no hay tendencia con respecto al gradiente altitudinal pero si hay evidencia de un leve aislamiento por distancia. Una explicación a esto podría ser la heterogeneidad ambiental en los diferentes pisos altitudinales, ya que la variabilidad de las condiciones climáticas puede determinar la diferenciación en la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética dentro de cada población (Lázaro-Nogal *et.al*, 2015).

En conclusión, las principales fuerzas evolutivas en las que interviene la historia de vida de *T. carlos-hankii* y que repercuten en su diversidad genética son el flujo genético y selección natural. Los genotipos mejor adaptados a las condiciones climáticas extremas presentes en las poblaciones establecidas a mayor altitud, se están manteniendo y están llegando al resto de las poblaciones gracias a la polinización por colibríes y a la dispersión por viento. El flujo genético mantiene comunicadas las 7 poblaciones por lo que no hay gran diferenciación y se encuentra sólo el 17% de la variabilidad genética, sin embargo, la

adaptación a las condiciones locales de diferentes genotipos y su supervivencia genera una gran variabilidad entre individuos (83 %).

Conservación

T. carlos-hankii está catalogada como una especie amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido a que es endémica al estado de Oaxaca, su distribución ocupa menos del 4% del territorio nacional. Crece en bosques mesófilos de montaña y bosques de pino- encino, ecosistemas altamente susceptibles al cambio climático y a la extracción de madera, respectivamente, por lo que se les considera vulnerables. Además, durante su época de floración es extraída para su venta en mercados locales. El conjunto de éstas características la colocaron en dicha categoría (amenazada), sin embargo gracias a los datos genéticos obtenidos en este estudio se puede decir que en el área de estudio, esta especie goza de buena salud genética. Al considerar diferentes pisos altitudinales se puede decir que es resistente a las fluctuaciones microclimáticas. Sin embargo, en caso de destinar esfuerzos para su conservación, éstos deben enfocarse a las áreas donde se comprende la mayor diversidad genética, en este caso, las zonas altas (Peña Prieta I, Peña Prieta II y Loma Grande. Lo cual es muy conveniente para el resto de las actividades que se realizan en el área, la zona de ecoturismo y de extracción tanto de bromelias como de madera comprende sitios a altitud intermedia (2500 y 2600 msnm) y de fácil acceso. Las poblaciones más diversas genéticamente se encuentran resguardadas por la inaccesibilidad geográfica, lo poco atractivo de los fenotipos y la poca variedad de árboles de interés comercial.

Conclusiones

Tillandsia carlos-hankii, con respecto de otras bromelias, presenta valores de diversidad genética alta.

Hay mayor porcentaje de variación entre individuos de cada población que entre poblaciones.

Las poblaciones establecidas a mayor altitud exhiben los valores de diversidad genética más altos, sin embargo, no hay una tendencia en los valores de diversidad genética con respecto a los pisos altitudinales.

Las poblaciones más cercanas geográficamente también son las más parecidas genéticamente, por lo que se puede decir que *T. carlos-hankii* presenta aislamiento por distancia.

Peña Prieta I, Peña Prieta II y Loma Grande son los sitios en los que se debiera promover la conservación de hábitat para garantizar la persistencia de esta especie de bromelia.

Literatura consultada

- ACEBEY, A. & T. KROMER. 2008.** Diversidad y distribución de las aráceas de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 465- 471.
- ACKERMAN JD, WARD S. 1999.** Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? *Systematic Botany*. 24: 282–291.
- ANDRADE J. L. Y P. S. NOBEL. 1997.** Microhabitat and water relation of epiphytic cacti and ferns in a lowland neotropical forest. *Biotropica* 29: 261-270.
- ÁVILA-DÍAZ I.Y OYAMA K. 2007.** Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic laeliaspeciosa (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94(2): 184–193.
- BARFUSS, M.H.J., SAMUEL, R., TILL, W., STUESSY, T.F. 2005.** Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany*. 92, 337–351.
- BARRETT SCH, KOHN JR. 1991.** Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. 3-30
- BECERRA & PAREDES. 1999.** Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. Instituto de investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu.
- BENZING DH, 1990.** Vascular epiphytes. General biology and related biota. Cambridge University press: Estados Unidos, 354pp.
- BENZING, D.H. 2000.** Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. *Cambridge University Press*, New York.
- BINFORD. I. C. 1989.** A distributional survey of the birds of the Mexican state of Oaxaca. *Ornithology Monograph*. 43: 1-418.
- BOISSELIER-DUBAYLE MC, SARTHOU C, SAMADI S. 2001.** Genetic structure of the *Saxicolepiscium pitcairniageyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany* 88: 861–868
- BOSCHERINI G., MORGANTE M., ROSSI P., VENDRAMIN G.G., VICARIO F., 1994.** Detection of DNA polymorphisms in *Pinus leucodermis* Ant. using random amplification. *Forest Genetics* 1 (3), 131-137.
- CARRANZA-QUICENO J.A, ESTÉVEZ-VARÓN J.V., 2008** Ecología de la polinización de Bromeliaceae en el dosel de los bosques neotropicales de montaña. *Boletín Científico del Museo de Historia Natural*. 12: 38-47.
- CASCANTE-MARÍN A., OOSTERMEIJER J. W., FUCHS, E. 2014.** Genetic Diversity and Spatial Genetic Structure of an Epiphytic Bromeliad in Costa Rican Montane Secondary Forest Patches. *Biotropica* 46(4): 425–432

- DEL CASTILLO R, TRUJILLO-ARGUETA S, RIVERA-GARCÍA R, GÓMEZ-OCAMPO Z, MONDRAGÓN. 2013.** Possible combined effects of climate change, deforestation, and harvesting on the epiphyte *Catopsis compacta*: a multidisciplinary approach. *Ecology and evolution*. 3(11): 3935-3946
- ESPEJO-SERNA A., LÓPEZ-FERRARI A.R., MARTÍNEZ-CORREA N., PULIDO-ESPARZA V.A., 2007.** Bromeliad flora of Oaxaca, México: richness and distribution. *Acta Botánica Mexicana* 81, 71-14.
- ESPEJO-SERNA A., LÓPEZ-FERRARI A.R., RAMÍREZ-MORILLO, I. HOLST B.K., LUTHER H.E., TILL W., 2004.** Checklist of Mexican Bromeliaceae with notes on species distribution and levels of endemism. *Selbyana* 25 (1), 33–86.
- EGUIARTE, L., 2009.** Nueva guía para principiantes en genética de poblaciones. In: Evolución Biológica. Una visión actualizada de la revista Ciencias, Morrone, J.J., Magaña, P., eds., Facultad de Ciencias, UNAM. México. p. 83-102.
- FERNÁNDEZ-RÍOS C., CHÁVEZ-SERVIA J.L., MONDRAGÓN.** Variation in number of ovules in *Tillandsia carlos-hankii* Matuda (Bromeliaceae) flowers. *Rev. Mex. de Agroecosistemas*. 1(1): 1-11
- FISHER, R.A. 1930.** The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon, Oxford.
- FLORES-PALACIOS, A. & J. GARCIA-FRANCO, 2006.** The relationship between tree size and epiphytes species richness: testing four different hypotheses. *Journal of Biogeography* 33: 323 – 330.
- FRANKEL, R. SOULÉ, M.E. 1981.** Conservation and evolution. Cambridge University Press. New York.
- FRANKHAM JD, BALLOU JD, BRISCOE DA, 2002.** *Introduction to conservation genetics*. University Press Cambridge: Reino Unido, 617 pp.
- GARCÍA E. 1988.** Modificaciones del Sistema de Clasificación Climática de Köppen. México: Instituto de Geografía, UNAM
- GARCÍA-MORALES E. 2007.** El uso de microsatélites en el análisis de la estructura genética de una metapoblación de *Tillandsia recurvata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias UNAM. México. 80pp
- GENTRY AH, DODSON CH. 1987.** Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74: 205–233.
- GITZENDANNER MA, SOLTIS PM. 2000.** Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*. 87: 783–792
- GIVNISH, T.J., MILLIAM, T.M., EVANS, T.M., HALL, J.C., BERRY, P.E., TERRY, R.G., 2004.** Ancient vicariance or long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *Int. J. Plant Sci.* 165 (4, Suppl.), 35–54.
- GIVNISH, T.J., MILLIAM, K.C., BERRY, P.E., SYTSMA, K.J., 2007.** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23, 3–26.

GONZÁLEZ, A., AGUIRRE, X., 2007. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). En: *Ecología Molecular*. Eguiarte, E.L., Souza, V. Aguirre, X. (Eds.) SERMARNAT-INE-CONABIO-UNAM. México.

GONZÁLEZ-ASTORGA J, CRUZ-ANGÓN A, FLORES-PALACIOS A, VOVIDES AP. 2004. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr.ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Ann Bot* 94: 545–551.

GULLISON R. & S. NISSAN. 1999. Evaluación de la factibilidad del modelado de los impactos del manejo forestal sobre la biodiversidad en la concesión Taruma. Documento técnico. USAID, Gobierno de Bolivia y Chemonics Internacional. Santa Cruz, Bolivia.

HAMRICK, J. L., Y. B. LINHART, AND J. B. MITTON. 1995. Relationships Between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173-200.

HAMRICK, J. L. and GOOT, M. T. 1996. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Eds. BROWN, A. H. D., CLEGG, M. T., KAHLER, A. L. and WEIR, B. S. pp. 43–63

HEDRICK, P. 2000. *Genetics of populations*. Jones and Barlett Publisher: Boston.

HEDRICK, P. W. 2011. *Genetics of Populations*. Cuarta edición. *Jones and Bartlett*. Estados Unidos.

HEWITT, G.M. 1999. Postglacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc* 68:87–112

HIETZ, P. & O. BRIONES. 1998. Correlation between water relations and whiting – canopy distribution of epiphytic ferns in a Mexican cloud forest. *Oecologia* 114: 305–316.

HOOPER EA, CH HAUFLE. 1997. Genetic diversity and breeding system in a group of neotropical epiphytic ferns (Pleopeltis; Polypodiaceae). *Am J Bot* 84(12):1664-1674.

IZQUIERDO LY. 1995. Estructura y variación genética en cuatro especies de *Aechmea* (Bromeliaceae) en México: *A. mexicana* (Barker), *A. lueddemanniana* (K. Koch) Grog. Ex Mez in Engl., *Pflanzenr*, *A. macvaughii* L. B. Smith y *A. tuitensis*. PhD Thesis, Centro de Ecología, UNAM.

JIMÉNEZ, P., COLLADA, C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y uso en los programas de conservación. *Investigación Agrícola y Sistemas de Recursos Forestales. Serie 2*. 237-238

KLUG, W.S., CUMMINGS, M.R., SPENCER, C.A., 2006. *Conceptos de Genética*. Octava Edición. Pearson Prentice Hill, España.

KRESS J. 1986. The systematic distribution of vascular epiphytes. *Selbyana* 9: 2–21.

KROMER, T., M. KESSLER, S.R. GRADSTEIN & A. ACEBEY. 2005. Diversity patterns of vascular epiphytes along an elevational gradient in the Andes. *Journal of Biogeography* 32:1799–1809.

- KROMER, T., M. KESSLER.& S. R. GRADSTEIN. 2007.** Vertical stratification of vascular epiphytes in submontane and montane forest of the Bolivian Andes: the importance of the understory. *Plant Ecology* 189: 261–278.
- KÖRNER, C., 2007.** The use of altitude in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 569-574.
- LANDE R. 1999.**Extinction risks from anthropogenic, ecological, and genetic factors. In: Landweber LA, Dobson AP, eds. Genetic and extinction of species. Princeton, NJ: *Princeton University Press*, 1–22.
- LI, Y.C., KOROL, A.B., FAHIMA, T., BEILES, A., NEVO, E. 2002.**Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11:2453–2465.
- LOO, J.A. 2011.** Manual de Genética de la Conservación. Principios Aplicados de genetica de la conservación de la diversidad biológica. *Comisión Nacional Forestal*. Primera edición, Mexico. 192pp
- LÓPEZ-FERRARI, R.A., ESPEJO-SERNA, A., 2007.** Tillandsiaborealis (Bromeliaceae) una nueva especie en el norte de México. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana* 80, 63-71.
- LOVELESS MD, HAMRICK JL. 1984.**Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*.15: 65–95
- MATALLANA G, GODINHO MAS, GUILHERME FAG, BELISARIO M, et al. (2010).** Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *PlantSyst. Evol.* 289: 57-65.
- MONDRAGÓN C. D. M., VILLA -GUZMÁN D. M., ESCOBEDO-SARTI G. J., FRANCO-MÉNDEZ, A. D., 2006.** La riqueza de bromelias epífitas a lo largo de un gradiente altitudinal en Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, México. *Naturaleza y Desarrollo – CIIDIR IPN* 4, 13–16.
- MONDRAGÓN, D., VILLA-GUZMAN D., 2008.** Estudio etnobotánico de las bromelias epífitas en la comunidad de Santa Catarina Ixtepeji. *Polibotánica* 26, 175-191.
- MONTAÑA C., R. DIRZO Y A. FLORES 1997.** Structural parasitism of an epiphytic bromeliad upon *Cercidium praecox* in an intertropical semiarid ecosystem. *Biotropica* 29: 517-521.
- MORENO S., GORGONCENA Y., ORTIZ J.M., 1997.** The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae (Netherlands)* 62 (4), 237-243.
- MÜLLER-STARCK G., SCHUBERT R., 2000.** Genetic markers as a tool for bioindication in forest ecosystem. En: YOUNG A., BOSHIER D., BOYLE T. (eds.). *Forest conservation genetics: principles and practice*. CSIRO-CABI, 227-237.
- MURAWSKI DA, HAMRICK JL , 1990.**Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. *Am J Bot* 77: 1201-1208

- OSHAWA T. 2008.**Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography, (Global Ecol. Biogeogr.)* **17** , 152–163
- PAGGI GM, PALMA-SILVA C, BERED F, CIDADE FW, SOUSA ACB, SOUZA AP, WENDT T. 2008.**Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic rain forest, and crossamplification in other species. *MolEcolResou* **8**: 980-982.
- RAHBEK, C. 1995.** The elevational gradient of species richness: a uniform pattern? *Ecography* **18**(2): 200–205.
- RANKER, T. A. 1992.**Genetic diversity of endemic Hawaiian epiphytic ferns: Implications for conservation. *Selbyana* **13**: 131–137.
- RIBEIRO P.C.C, PINHEIRO L.C, DOMINGUES. R, FORZZA R.C., MACHADO M.A, VICCINI L.F. 2013.**Genetic diversity of *Vriesea caccuminis* (Bromeliaceae): an endangered and endemic Brazilian species. *Genetics and Molecular Research.* **12** (2): 1934-1943
- ROSE, O., FALUSH, D. 1998.** A Threshold size for microsatellite expansion. *Molecular Biology Evolutionary* **15**: 613-615.
- de México. *Acta Botánica Mexicana.* **35**: 25-44.
- SARTHOU, C. et al. 2003.** Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L.B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Mol. Ecol. Not.* **3**: 221_223.
- SELKO K.A., TOONEN R.J. 2006.**Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* **9**:615-629.
- SMITH, L. B., AND R. J. DOWNS. 1977.** Tillandsioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica(monograph 14, part 2). Hafner Press, New York, NY.
- SOLTIS DE, GILMARTIN AJ, RIESEBERG L, GARDNER S. 1987.**Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae) *American Journal of Botany* **74**: 531–537.
- SORK, V. L. DAVIS, SMOUSE F.W., APSIT P. E., DYER V. J., FERNANDEZ R. J. 2002.** Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone? *Molecular Ecology.* **11**: 1657-1668.
- SUDGEN, A. & R. ROBINS. 1979.** Aspects of the ecology of Vascular Epiphytes in Colombian cloud forest, I. The Distribution of the epiphytic flora. *Biotropica* **11** (3): 173-188.
- SLATKIN M. 1994.**Gene flow and population structure. In: Real L, ed. Ecological genetics, Princeton, NJ: Princeton University Press, 3–17
- TRAPNELL, D. W., J. L. HAMRICK, C. D. ISHIBASHI, AND T. R. KARTZINEL. 2013.** Genetic inference of epiphytic orchid colonization; it may only take one. *Mol. Ecol.* **22**: 3680–3692.
- TREMBLAY RL, ACKERMAN JD. 2001.** Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society.* **72**: 47–62

- TABERLET, P., FUMAGALLI, L., WUST-SAUCY, A.-G. & COSSON, J-F. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization route in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453– 464.
- TRUANG, C., PALMÉ, A.E. & FELBER, F. 2007.** Recent invasion of the mountain birch *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* above the treeline due to climate change: genetic and ecological study in northern Sweden. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 369–380
- VERSIEUX, L. M AND WENDT, T .2007.** Bromeliacea diversity and conservation in Minas Gerais State, Brazil. *Conserv. Genet.* **16**: 2989-3009
- VICTORIA, V.N., 2009.** Distribución de epífitas vasculares a lo largo de un gradiente altitudinal en Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, México. Tesis de maestría, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, México.
- ZACARÍAS-ESLAVA, Y., DEL CASTILLO-SÁNCHEZ, R.F. 2010.** Comunidades vegetales templadas de la Sierra Juárez, Oaxaca: pisos altitudinales y sus posibles implicaciones ante el cambio climático. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana* **87**, 13-28.
- ZENGER, K. R. et al. 2003.** A rapid population expansion retains genetic diversity within European rabbits in Australia. *Mol. Ecol.* **12**: 789-794.
- ZIETKEWICS, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D., 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction. *Genomics*, **20**: 176-183.
- ZOTZ, G. & ANDRADE J. L. 2002.** La ecología y la fisiología de las epífitas y las hemiepífitas. Capítulo 12: 271-296. En: M. R. Guariguata & G. H. Catan (Eds.) *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Editorial Libro Universitario Regional, Costa Rica.

